

## ⑫ 公開特許公報 (A)

昭55—379

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和55年(1980)1月5日

C 07 D 213/04

7138—4C

213/20

7138—4C

213/26

7138—4C

215/10

7306—4C

C 09 B 11/26

6859—4H

G 01 N 31/22

1 2 3

6514—2G

発明の数 4

審査請求 未請求

(全 11 頁)

⑮ビス-(2,4-ジニトロフェニル)-メチル-ピリジニウム化合物、その製法及び同化合物を含有するpH測定剤

⑯特 願 昭54—59206

⑰出 願 昭54(1979)5月16日

優先権主張 ⑱1978年5月17日⑲西ドイツ (DE)⑳P2821501.2

㉑発 明 者 アンゼルス・ローテ  
ドイツ連邦共和国ビルケナウ・

イム・シユヴァンクリンゲン20  
⑰出 願 人 ベーリンガー・マンハイム・ゲ  
ゼルシャフト・ミット・ベシユ  
レンクテル・ハフツング  
ドイツ連邦共和国マンハイム・  
ヴァルトホーフ・ザント・ホー  
フェル・ストラーセ112-132  
㉒代 理 人 弁護士 ローランド・ゾンデル  
ホフ 外1名  
最終頁に続く

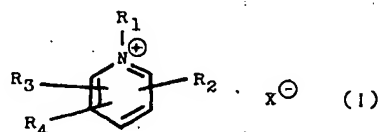
## 明 細 書

## 1 発明の名称

ビス-(2,4-ジニトロフェニル)-メチル-ピリジニウム化合物、その製法及び同化合物を含有するpH測定剤

## 2 特許請求の範囲

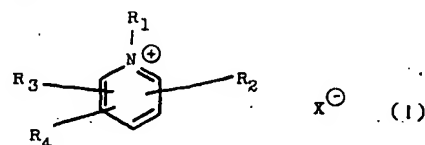
## A 一般式 I :



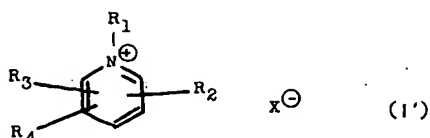
〔式中：R<sub>1</sub> 及び R<sub>2</sub> の中の / つはビス-(2,4-ジニトロフェニル)-メチル基を表わし、他は低級アルキル基、特にメチル基又は第三ブチル基又は、R<sub>2</sub> の場合には、水素原子又はトリフルオルメチル基を表わし、R<sub>3</sub> 及び R<sub>4</sub> は水素原子を表わすか又は、それらが結合している各炭素原子と一緒にベンゼン環を形成し、X<sup>⊖</sup> は適当な酸陰イオンを表わすか、又は同式の化合物はベタインとして存在

する) のビス-(2,4-ジニトロフェニル)-メチル-ピリジニウム化合物

## 2 一般式 I :

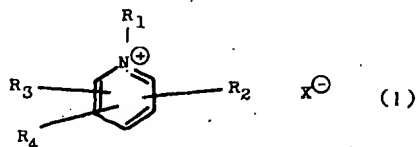


〔式中：R<sub>1</sub> 及び R<sub>2</sub> の中の / つはビス-(2,4-ジニトロフェニル)-メチル基を表わし、他は低級アルキル基、特にメチル基又は第三ブチル基又は、R<sub>2</sub> の場合には、水素原子又はトリフルオルメチル基を表わし、R<sub>3</sub> 及び R<sub>4</sub> は水素原子を表わすか又は、それらが結合している各炭素原子と一緒にベンゼン環を形成し、X<sup>⊖</sup> は適当な酸陰イオンを表わすか、又は同式の化合物はベタインとして存在する) のビス-(2,4-ジニトロフェニル)-メチル-ピリジニウム化合物を製造するに当り、一般式 I' :



〔式中： $R_1$  及び  $R_2$  の中の / つはジフェニルメチル基を表わし、他の基及び  $R_3$ ,  $R_4$  及び  $X^\ominus$  は上記のものを表わす〕の化合物をニトロ化し、引続いて  $X^\ominus$  を自体公知の方法で別の基  $X^\ominus$  と置換するか又はアルキル基  $R_1$  を導入してもよいことを特徴とするビス-(2,4-ジニトロフェニル)-メチル-ピリジニウム化合物の製法

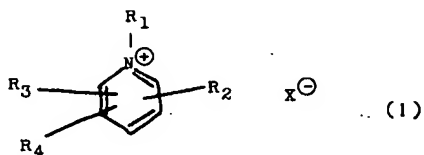
## 3. 一般式 I :



〔式中： $R_1$  はビス-(2,4-ジニトロフ

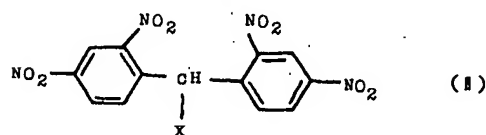
エニル)-メチル基を表わし、 $R_2$  は低級アルキル基、特にメチル基又は第三ブチル基又は、 $R_2$  の場合には、水素原子又はトリフルオルメチル基を表わし、 $R_3$  及び  $R_4$  は上記のものを表わす〕の化合物と反応させ、引続いて  $X^\ominus$  を自体公知の方法で別の基  $X^\ominus$  と置換するか又はアルキル基  $R_1$  を導入してもよいことを特徴とするビス-(2,4-ジニトロフェニル)-メチル-ピリジニウム化合物の製法

## 4. 一般式 :

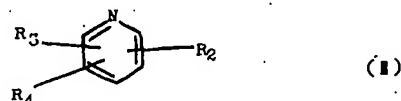


〔式中： $R_1$  及び  $R_2$  の中の / つはビス-(2,4-ジニトロフェニル)-メチル基を表わし、他は低級アルキル基、特にメチル基又は第三ブチル基又は、 $R_2$  の場合には、水素原子又はトリフルオルメチル基を表わし、 $R_3$  及び  $R_4$  は水素原子を表わすか又は、それらが結合している各炭素原子と一緒にベンゾール環

を形成し、 $X^\ominus$  は適当な酸陰イオンを表わすか、又は同式の化合物はベタインとして存在する〕のビス-(2,4-ジニトロフェニル)-メチル-ピリジニウム化合物を製造するに当り、式 II :



〔式中： $X$  は  $Cl$ ,  $Br$  又は  $J$  を表わす〕の化合物を式 I :



を形成し、 $X^\ominus$  は適当な酸陰イオンを表わすか、又は同式の化合物はベタインとして存在する〕のビス-(2,4-ジニトロフェニル)-メチル-ピリジニウム化合物を含有することを特徴とする pH 測定剤

5. 尿素試験においてアンモニアを測定するために使用する特許請求の範囲第4項記載の pH 測定剤

## 3 発明の詳細な説明

反射光度法は、特に試験紙を簡単に又容易に評価出来、又それに伴つて費用を節約出来るために臨床化学において使用される様になつた。同測定は分光光度計及び線光度計と異なつて広いスペクトル域を測定領域とする非常に安価な装置で行われるべきである。この種の装置は例えば西ドイツ国特許明細書第 2056232 号に記載されている。

十分な測定感度を保証するためには、同装置で測定される帯状試験シートは急勾配の吸収ピークではなくて巾広の吸収帯を示す指示薬を含

有しななければならない。

吸収帯の大部分はその様な装置中で有利に使用されるグロー電球の発光性に適合すべきであり、従つて600nm以上であるべきである。その上反応により出来るだけ大きな色の差及びそれによつて明確な測定シグナルを生じさせるために、測定対象ではない分子形は反射光度計の記録範囲外の領域でのみ吸収するという条件が指示薬に要求される。つまり一般にその様な分子形は無色～黄色を呈示しなければならない。

その様な帯状試験シートは例えば体液例えば血液、血清等からの迅速及び定量的グルコース測定用のものとして西ドイツ国特許明細書第2264438号に記述されている。

安価な反射光度計で測定される指示薬に対する上記の要求に対応して上記の帯状試験シートはベンジジンの誘導体を含む。これはその還元された形において无色～黄色であり、従つて非常に低波の領域で吸収する。これに対して酸化生成物は近赤外線に至る巾広の波長領域にわたつて吸収する。

示薬が使用される。

入手が容易で、上記のスペクトル条件をみたし、同時に十分な溶解性と適当なpK値を有するpH指示薬は従来未公知であつた。

公知の2化合物—ヘキサニトロフェニルメタン及び2-ビス(2,4-ジニトロフェニル)-酢酸エチルエステル—は確かに使用可能な吸収性を有するが、他方溶解度が小さすぎ、ないしはpK値が高すぎる。

別の公知のpH指示薬は使用不可能である。それというのもその酸性形も塩基性形も巾広の波長領域にわたつて吸収し、そのため反射光度計で明確に相互を分離出来ないか、又は呈色形が多かれ少なかれ急勾配のピーク中でのみ吸収し、従つて巾広の波長領域のみを捕捉する簡単な装置では測定が不可能であるからである。

従つて本発明の課題は、その酸性形では未呈色で、その塩基性形では強く呈色し、かつその呈色は巾広の吸収帯を有するpH指示薬を提供することであつた。この指示薬を帯状試験シート

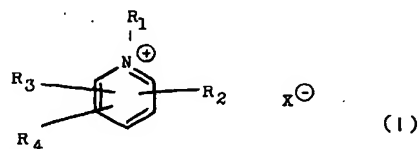
域にわたつて吸収する。

血液中の尿素含量の測定のためには取扱いが簡単で、反応時間が短かく、かつ正確な反射光度計測定が可能な帯状試験シートは今まで未公知であつた。特に緊急の場合、例えば尿毒症による昏睡状態の様な場合には、最初に行うべき治療手段として最短時間で出来るだけ正確な分析結果を得ることが必要不可欠である。しかし又病院の実験室の日常作業においても反射光度計で評価出来る尿素迅速テストを導入することにより明らかな進歩が達せられるであろう。それというのもそれによつて長々しいピペット測定、一部保存性が低く腐蝕性の試薬の使用及び長い反応時間が不要になるからである。

その様な尿素-帯状試験シートの開発は今までは適当な指示薬が欠けていたために不成功であつた。レドックス指示薬を使用する上記のグルコース試験シートと異なり、尿素を検出する臨床化学においては反応連鎖における呈色指示薬として生成アンモニアを検出するためのpH指

に製作し得るために、その少なくとも1つの形が十分な溶解性を有さなければならない。その上尿素試験シートに妥当な、つまりアンモニアの検出を可能ならしめるpH範囲に調整出来る十分低いpK値(例えば5~10.5)が求められる。

一般式I:

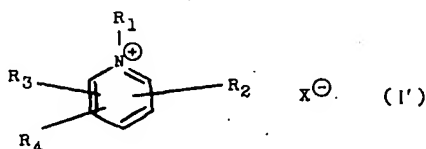


(式中:  $R_1$  及び  $R_2$  の中の1つはビス-(2,4-ジニトロフェニル)-メチル基を表わし、他は低級アルキル基、特にメチル基又は第三ブチル基又は、 $R_2$  の場合には、水素原子又はトリフルオルメチル基を表わし、 $R_3$  及び  $R_4$  は水素原子を表わすか又は、それらが結合している各炭素原子と一緒にベンゼン環を形成し、 $X^-$  は適当な酸陰イオンを表わすか、又は同式の化

化合物はベタインとして存在する)のビス-(2,4-ジニトロフェニル)-メチル-ピリジニウム化合物が上記の条件をみたす化合物であることが見出された。

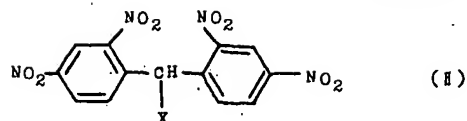
本発明による新規化合物は以下の様にして製造出来る。

a) 式 I' :

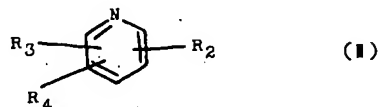


[式中: R<sub>1</sub> 及び R<sub>2</sub> の中の1つはジフェニルメチル基を表わし、他の基及び R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> 及び X<sup>-</sup> は上記のものを表わす]の化合物をニトロ化する、又は

b) 式 I 中で R<sub>1</sub> がビス-(2,4-ジニトロフェニル)-メチル基を表わす化合物を製造するためには、式 II :



[式中: X は Cl, Br 又は J を表わす]の化合物を式 II :



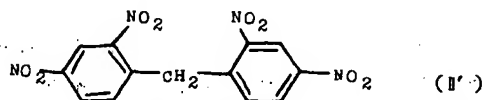
[式中: R<sub>2</sub> は水素原子又は低級アルキル基を表わし、R<sub>3</sub> 及び R<sub>4</sub> は上記のものを表わす]の化合物と反応させる。引続いて上記 a) 又は b) の方法で得られた化合物中で基 X<sup>-</sup> を自体公知の方法で別の基 X<sup>-</sup> と置換するか又はアルキル基 R<sub>1</sub> を導入することも出来る。

式 I' の化合物のテトラニトロ化は比較的高エネルギーの条件を必要とするので、有利に発煙硝酸とオレウムとの混合物を用い、20~100℃の温度で行う。その場合基 X<sup>-</sup> はあらかじめ

又は、反応媒質中の過剰の硫酸により硫酸基に変換される。

式 II 及び式 II' の両化合物間の反応は有利に化合物 II' の過剰量を溶剤としてその中で行う。しかし別の不活性溶剤例えば芳香族炭化水素、エーテル、ジオキサン、アセトン等を使用することも出来る。化合物 II' は相当する公知のカルピノールをハロゲン化水素酸と反応させることによるか又はメチレン化合物を相当するハロゲン原子と不活性溶剤中で反応させることにより製造出来る。式 I' の出発化合物が公知でない限り、同化合物を製造するためにも上記方法を使用することが出来る。

K. 松村の方法 (ジャーナル オブ ジ アメリカン ケミカル ソサイエティ (J. Am. Chem. Soc.) / 929 年第 5 / 巻 8 / 7 頁) によりジフェニルメタンのニトロ化によつて製造出来る、化合物 II' に相当する下記の式 II' :



のメチレン化合物を過剰量のピリジン II' 中に溶かし、モル量の臭素又は炭素を徐々に添加することによつて化合物 II' をその場で生成させる方法が特に有利である。場合により不活性溶剤例えばベンゼン、エーテル等を添加することも出来る。その場合には式 I' の所望の化合物はハロゲン化物として難溶性の形で生成する。

出発化合物 I' 中へのアルキル基 R<sub>1</sub> の導入は自体公知の方法でアルキル化剤例えばハロゲン化アルキル、硫酸ジアルキル又はアルキルスルホン酸エステルを用い不活性溶剤例えばトルオール、エーテル、ジオキサン、アセトン等中で行われる。

基 X<sup>-</sup> の他のものへの置換は、その陽イオンが除去すべき基 X<sup>-</sup> と難溶性で容易に分離出来る塩を形成する相当する酸 HX 又は有利にはその塩の相当する過剰量との反応により行われる。

更に塩基例えばアンモニア水又はアルカリを添加することによつてペタインを製造出来、これは所望の場合には別の酸を添加して更に新規第四塩に変換することが出来る。

本発明によるpH指示薬の有利な適用は尿素試験(同一出願人の同日付特許願(1)参照)である。後記の例7に記載の様に、本発明による化合物を使用して、反射光度計の測定領域の66.5%を呈示範囲とする定量尿素試験具を製造することも出来る。従来のpH指示薬(例えばプロムフェノールブルー)を使用する場合には、測定領域の約23%しか呈示しないので、視覚的に判定出来る半定量試験具しか得られない(例8)。もちろん本発明による化合物はpH指示薬自体としても、場合により別のpH指示薬と一緒に混合指示薬の形でより大きなpH範囲用に使用することも可能である。

本発明は以下の実施例により詳述される。

例 1

1-[ビス-(2,4-ジニトロフェニル)メ

チルピリジニウム-プロミド/2.42g=3:1.5%を得る。濃縮した母液及び処理作業(過剰量の10%臭化水素酸での酸性化、沈殿物質の吸引濾過)を行つた母液からメタノール-エーテルからの再結晶化及びアセトンとの攪拌の後で上記の化合物が更に4.1g=9.6%得られる。薄層クロマトグラフイー社のシリカゲル60F 254

展開剤: イソプロパノール-酢酸エステル-H<sub>2</sub>O 5:1:3:2, R<sub>F</sub>値=0.6  
トルオール-アセトン3:7, R<sub>F</sub>値=0.6(両展開剤共ガス状アンモニアの存在下で使用)

検 出: アンモニア(ガス)

b) 沃化物

同様の方法で融点217℃の1-[ビス-(2,4-ジニトロフェニル)メチル]-4-第三-ブチルピリジニウム-ヨードイドを得る。収率: 25.6%。(製造の際は沃素原子の代りに第三ブチルピリジン中に溶かした沃素の溶液

チル)-4-第三-ブチルピリジニウム-ハロゲンイド

a) 臭化物

ビス-(2,4-ジニトロフェニル)-メチル2.64g(0.076モル)を第三ブチルピリジン12.5ml=1/4.38g(0.976モル)中に懸濁させ、0~5℃において乾燥臭素12.4g=4ml(0.155モル)を攪拌下に徐々に滴加する。次いで室温において6時間攪拌し、沈殿した反応生成物を迅速に吸引濾過し、第三ブチルピリジン10mlで洗浄し、フィルタケーキを10%の臭化水素酸100mlと共に攪拌し、氷浴中に入れて冷却し、再び迅速に吸引濾過する。フィルタ残渣をメタノール200ml中に加熱下に溶かし、場合によつて存在するかも知れない不溶分を吸引濾過により分離し、エーテル50mlを添加して臭化物を沈殿させる。アセトン50mlと一緒に十分に攪拌することにより融点204~206℃の精製1-[ビス-(2,4-ジニトロフェニル)メチル]-4-第三-ブ

チル)を使用する)。

c) 塩化物

同様の方法で融点172~173℃の1-[ビス-(2,4-ジニトロフェニル)メチル]-4-第三-ブチルピリジニウム-クロリドを得る。収率: 31.6%。塩素原子の代りに氷酢酸中の塩素の溶液を使用する。その他は上記a)及びb)に記載と同様に行う。

沃化物を塩化物も薄層クロマトグラフイーにおいて、上記の展開剤を使用する場合には臭化物と同様の挙動を示す。

例 2

1-[ビス-(2,4-ジニトロフェニル)メチル]ピリジニウム-プロミド

4-第三ブチルピリジンの代りにピリジンを使用して例1と同様に作業する。薄層マトグラフイー分析で均一な1-[ビス-(2,4-ジニトロフェニル)メチル]-ピリジニウム-プロミドを得る。分子量: 506.24, 融点: 199~200℃, 収率: 25.6%。

同臭化物のメタノール溶液から35%のテトラフルオル硼酸での処理によりテトラフルオル硼酸塩が沈殿する。分子量：513.26、融点：190～191℃。

薄層クロマ：固定プレート、メルック(Merck)トグラフイー

社のシリカゲル60F 254

展開剤：アセトン、R<sub>F</sub>値=0.4

検出：紫外線、アンモニア(ガス)

例 3

1-(ビス-(2,4-ジニトロフェニル)メチル)キノリニウム-プロミド

4-第三ブチルピリジンの代りにキノリンを使用する。反応及び処理は例1と同様に行う。メタノール-エーテル及びアセトン-エーテルからの分別結晶により、クロマトグラフイー分析で均一な1-(ビス-(2,4-ジニトロフェニル)メチル)キノリニウム-プロミドを得る。融点：186～188℃、収率：25.2%。

薄層クロマ：固定プレート、メルック(Merck)トグラフイー

社のシリカゲル60F 254

を添加して沈殿させる。所望の化合物の他にないいくつかの副生成物を含有する粗生成物を、溶剤としてアセトンを使用するシリカゲルカラムでクロマトグラフイー精製を行う。クロマトグラフイー分析で均一な無定形硫酸水素塩5.6gが得られ、これをメタノール中で38%の含水硼酸水素酸と反応させることにより、1-(ビス-(2,4-ジニトロフェニル)メチル)ピリジニウム-テトラフルオル硼酸塩4.8g=20.7%を得る。融点：187～191℃。

例 5

(ジフェニルメチル)-1-メチルピリジニウム-ヨーテイド

ジフェニル-ピリジルメタン0.1モルをトルオール200ml中に懸濁させ、沃化メチル51.25g=45ml(0.36モル)を添加し、還流下で2時間加熱する。室温に冷却し、同反応混合物にエーテル50mlを添加し、分離した結晶を吸引ろ過し、エーテルで十分に洗浄し、五酸化二磷上で乾燥する。出発化合物の置換に応じて以下

展開剤：アセトン、R<sub>F</sub>値=0.6

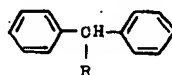
検出：アンモニア(ガス)

例 4

1-(ビス-(2,4-ジニトロフェニル)メチル)ピリジニウム-テトラフルオル硼酸塩

ジフェニル-メチル-ピリジニウム-プロミド(ジフェニルプロムメタンを過剰量のピリジンと共に加熱し(30秒/120℃)、濃縮し、エーテルと共に攪拌することにより得られる。融点：216～219℃)16.3g(0.05モル)を濃硫酸30ml中に溶かし、CO<sub>2</sub>を1時間にわたり溶液に通じ、80℃に加熱し、室温に冷却し、同硫酸溶液を、濃硫酸30mlと発煙硝酸8.65gとからなる混合ニトロ化剤中に15分間以内に滴加し、その際温度を50℃以下に保持する。引続いて硝酸(D<sub>N</sub>=1.52)11.4mlとオレウム(SO<sub>3</sub>含量15%)42.5mlとの混合物を滴加し、次いで3時間70℃に加熱し、冷却後に氷600ml上に注ぐ。黄色沈殿物をアセトン-イソプロパノールに溶かし、エーテル

の生成物が得られる。



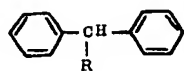
分子量：387.2

R	融点	収率
J <sup>⊖</sup>	228℃(分解)	98.1%
J <sup>⊖</sup>	160℃(分解)	91.6%
J <sup>⊖</sup>	152-155℃(分解)	96.5%

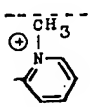
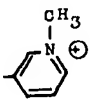

(ジフェニルメチル)-1-メチルピリジニウム-硝酸塩

上記の(ジフェニルメチル)-1-メチルピリジニウム-ヨーテイド0.1モルをメタノール500ml中に溶かし、メタノール400mlと水100mlとの混合物中の硝酸銀0.1モルの溶液

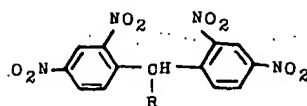
を添加し、1時間室温で攪拌し、次いで生成した沃化銀を吸引濾過し、濾液を回転蒸発機で濃縮する。蒸留残液を少量のメタノール中に溶かし、エーテルを添加して硝酸塩を沈殿させる。吸引濾過、エーテルでの洗浄及び五酸化二磷上での乾燥後に精製硝酸塩を無色結晶体の形で得る。



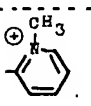
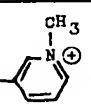
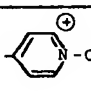
分子量: 322.3

R	融点	収率
 $\text{NO}_3^-$	171 °C	93.8 %
 $\text{NO}_3^-$	138 °C	88.4 %
 $\text{NO}_3^-$	176-178 °C	96.3 %

る。



分子量: 547.3

R	融点	収率	DC* 展開剤	R <sub>F</sub>
 $\text{HSO}_4^-$	70 °C以上 で無定形半融	31.5 %	XM キシローン -メチルエ チルケトン 1:1	0.21
 $\text{HSO}_4^-$	120 °C以上 で無定形半融、分解	25.6 %	DEW 2/1 n-ブタノ ール:氷酢 酸:水 2:1:1	0.19
 $\text{HSO}_4^-$	70 °C以上 で無定形半融	32.1 %	インプロパ ン酢酸- n-ブタノ ール:水-ア ンモニア 50:30:15:8	0.45

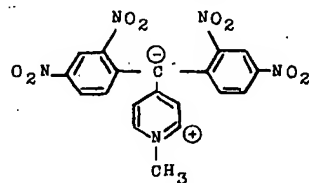
\*DC-固定プレート、メルック(Merck)社のシリカゲル60F 254

(ビス-(2,4-ジニトロフェニル)メチル)  
-1-メチルピリジニウム-硫酸水素塩

攪拌機、冷却機、温度計及び滴下漏斗を備えた500mlの三頸フラスコ中に濃硫酸( $r=1.84$ )90g=50ml=0.98モル中の硝酸( $r=1.52$ )7.8ml=2.72g=0.431モルを入れ、攪拌しながら前記の(ジフェニルメチル)-1-メチルピリジニウム-硝酸塩の1つ16.1g(0.05モル)を、反応混合物の温度が50°Cを越えない様に、添加する。次いで徐々に70°Cに加熱し、同温度においてオレウム( $\text{SO}_3$ 含量15%)60mlと硝酸( $r=1.52$ )30ml=47.5g=0.75モルとの混合物を滴加し、1時間90°Cに加熱し、引続いて水500ml上に注ぐ。得られた粗生成物を少量のメタノール中に加熱下に溶かし、活性炭で処理し、吸引濾過し、エーテルを添加して硫酸水素塩を沈殿させる。再びアセトン-エーテルから再溶解してクロマトグラフィー分析で均一なテトラニトロ化合物の無定形硫酸水素塩を得

ビス-(2,4-ジニトロフェニル)-(1-メチル-ε-ピリジノ)メタニド

前記の硫酸水素塩を水に溶かし、アンモニア又は稀アルカリをpH値が9~10.5になるまで添加する。深青色~紫色を示すピリジノ-ベタインを吸引濾過し、水、引続いて石油エーテル-リグロイン1:1で洗浄し、五酸化二磷上で乾燥して上記化合物を得る。これは加熱の際に溶解することなく分解する。



分子量: 438.5

xの位置	分解温度	収率	pK-値	吸収(μm)
2	>225°C	90.2%	9	400-800
3	>238°C	93.5%	10.5	400-900
4	>233°C	95.1%	6.5	400-810

## 例 6

ビス-(2,4-ジニトロフェニル)-(4-第三-ブチル-1-ピリジノ)メタニド

1-(ビス-(2,4-ジニトロフェニル)メチル)-(4-第三-ブチル-1-ピリジニウム)プロミド又は-テトラフルオル硼酸塩(粗プロミドのメタノール溶液に38%のテトラフルオル硼酸を添加して製造、融点: 204~205℃)40g(0.071モル)を48%の臭化水素酸2mlの添加下にジメチルホルムアミド300ml中に溶かし、強力を攪拌及びガラス電極でのコントロールを行いながら5%の苛性カリのエタノール溶液950mlを滴加してpH値10に調整する。次いで沈殿した1-(ビス-(2,4-ジニトロフェニル)-4-第三-ブチル-1-ピリジノ)メタニドを上澄液を傾倒してから水3ℓで洗浄し、同ベタインをシリカゲル及び五酸化二磷上で乾燥する。金属状の光沢を有する目的化合物33.5g=97.8%を得る。同化合物は225℃において溶解する

ことなく分解する。

薄層クロマト: 固定プレート、メルック(Merck)グラフィー

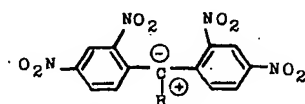
社のシリカゲル60F 254

展開剤: イソプロパノール: 酢酸-ロ-ブチルエステル-水5:3:2

R<sub>F</sub>値=0.63

相当する塩のDMF(ジメチルホルムアミド)溶液をDMF-アンモニアの混合物中に入れ、pH値9~10に調整し、引続いて4倍の量の水を添加してベタインを沈殿させ、次いで上記の様に処理する方法によつても上記ピリジニウムベタインを製造することが出来る。

同様の方法で一般式:



を有する下記のベタインが製造される。

R <sup>+</sup>	分解温度	収率	値	吸収(nm)
 分子量: 481.4	>225 °C	97.8%	8.5	400-850 吸収スペクトルは第2図に示されている*
 分子量: 425.3	>250 °C	96.5%	8.5	400-800
 分子量: 475.3	>210 °C	95.6%	8	400-850
 分子量: 475.3	230 °C	96.6%	7	400-850

\*ビス-(ジニトロフェニル)-4-第三-ブチルピリジノ-メタニドの吸収スペクトル:

濃度: 0 = 3.58 × 10<sup>-5</sup>モル

溶剤: メタノール + 10% 磷酸塩緩衝剤 pH 10

層厚さ: d = 1.0 cm

## 例 7

## 血清中の尿素の定量検出

## a) ウレアーゼ紙

濾紙を下記の組成の溶液で含浸し、乾燥し、

6mm巾の帯状体に切断する。

ウレアーゼ(5U/eq) 6g

ジチオエリトリット 0.1g

0.3M TRIS-HCl-緩衝剤 pH 8.5 100ml

## b) 指示薬紙

濾紙を下記の組成の溶液で含浸し、乾燥し、

同様に6mm巾の細片に切断する。

N-(ビス-(2,4-ジニトロフェニル)-メチル-4-第三-ブチルピリジニウム-クロリド 0.39g

エチレングリコールモノメチルエーテル 42ml

0.25M マロン酸ナトリウム緩衝剤 pH 2.8 48ml

## c) スペーサー



シリコン樹脂で疎水化された、糸太さ約  
100 $\mu$ 及び開孔度約35%のスクリーンファ  
ブリックを25~40 $\mu$ 巾の帯状体に切断する。

#### d) 被覆ネット

厚さ約60 $\mu$ 、織度40 $\mu$ 、開孔度約65%  
の親水性ナイロンネットを15 $\mu$ 巾の帯状体に  
切断する。

#### e) フォイル

把手の機能を有する担体フォイルとして溶融  
接着剤でコートされたポリエステルフォイル製  
の6~10 $\mu$ 巾、約0.2~0.3 $\mu$ 厚さの帯状体  
を使用する。

#### 帯状試験シートの製作

ウレアーゼ紙3、指示薬紙1及びスペーサ  
2をウレアーゼ紙被覆用のネット4と一緒に、  
第1図に示されている様に、溶融接着剤でコ  
ートされた6~10 $\mu$ 巾のフォイル5の端部上に  
シールし、形成された帯状体を6 $\mu$ 巾の細片に  
切断して6~10 $\mu$ 長さの把手上に設けられた  
6 $\times$ 6 $\mu$ -試験域を形成する。

#### b) 指示薬紙

伊紙を下記の組成の溶液で含浸し、70℃で  
乾燥する。

フロムフェノールブルー	0.1 g
エチレングリコールモノメチル エーテル	9 ml
酒石酸	0.4 g
水	21 ml

#### c) スペーサー

シリコン樹脂で疎水化された、厚さ約80  
 $\mu$ のポリアミドフリース

#### d) 被覆ネット

例7参照

帯状試験シートの製作は例7と同様に行う。

全血液中の尿素測定を行うために血液1滴を  
滴下する。7分間の反応時間後に尿素含量に応  
じて視覚的に良く判別出来る反応色が生じる。

20 $\mu$ 尿素/100 $\mu$ 血液	黄色
40 $\mu$ 尿素/100 $\mu$ 血液	帯緑黄色
60 $\mu$ 尿素/100 $\mu$ 血液	黄緑色

同帯状シートの被覆ネット上に血清10 $\mu$ l  
を滴下し、接着ラベルで閉鎖する。7分間の反  
応時間後にウレアーゼ紙と被覆ネットとをスペ  
ーサーと一緒に除去する。指示薬紙の呈色を上  
方から反射光度計で測定する。尿素濃度に依存  
して以下の様な測定値が得られる。

mg尿素/100ml血清	測定シグナル(目盛) $\pm$ 1 $\sigma$ 10 測定値からの平均値
20	12.9 $\pm$ 0.75
40	27.5 $\pm$ 1.5
60	46.1 $\pm$ 1.9
80	61.5 $\pm$ 1.4
100	69.0 $\pm$ 0.4
150	77.2 $\pm$ 0.5
200	79.4 $\pm$ 0.5

#### 例 8

#### 血液中の尿素の半定量検出

#### a) ウレアーゼ紙

例7参照

80 $\mu$ 尿素/100 $\mu$ 血液	緑色
100 $\mu$ 尿素/100 $\mu$ 血液	青緑色
150 $\mu$ 尿素/100 $\mu$ 血液	帯緑青色
200 $\mu$ 尿素/100 $\mu$ 血液	青色

#### 4 図面の簡単な説明

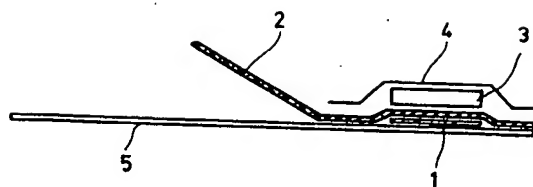
第1図は本発明によるpH測定剤を指示薬とし  
て使用した帯状試験シートの1実施形式の構成  
を示す図面、第2図は本発明による化合物の1  
つであるビス-(ジニトロフェニル)-4-第  
三-ブチルピリジノ-メタニドの吸収スペクト  
ルを示す図面である。

1…指示薬紙、2…スペーサー、3…ウレア  
ーゼ紙、4…被覆ネット、5…把手

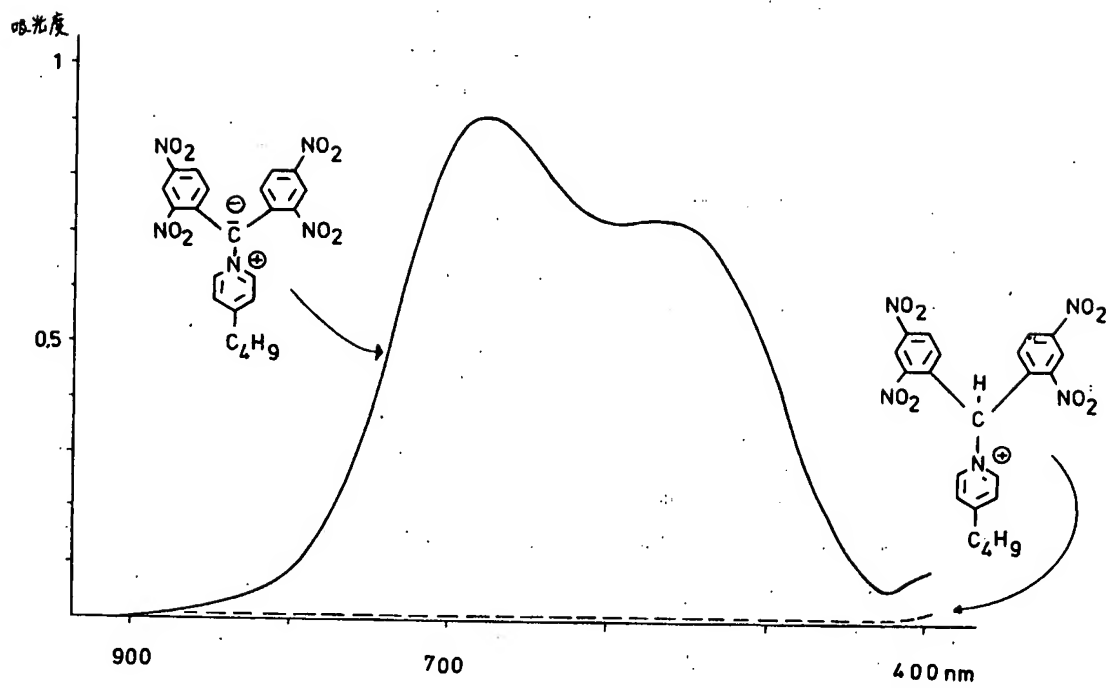
代理人 弁護士 ローランド・ゾンデルホフ  
(ほか1名)



第 1 図



第 2 図



第1頁の続き

- ⑦発明者 ヴエルナー・ギユートライン  
ドイツ連邦共和国マンハイム24  
イム・ゼンタイヒ31
- ⑧発明者 ヴアルター・リタースドルフ  
ドイツ連邦共和国マンハイム31  
カツセラー・シュトラッセ6
- ⑨発明者 ヴォルフガング・ヴェルナー  
ドイツ連邦共和国マンハイム42  
マイセナー・ヴェーク39